

09/890688

06.12.00

JP 00/8631

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

RECD 05 FEB 2001

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2000年 3月14日

出願番号

Application Number:

特願2000-071161

出願人

Applicant (s):

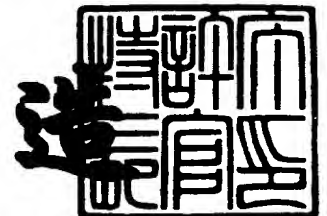
科学技術振興事業団

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 1月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3113320

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP00110-YS

【提出日】 平成12年 3月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/00
C12N 15/12

【発明の名称】 ヒト蛋白質と c D N A [9]

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市若松 3 - 4 6 - 5 0

 【氏名】 加藤 誠志

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市西大沼 2 - 5 2 - 1 2
 グリーンヴィラ 3 0 1 号

 【氏名】 佐伯 美帆呂

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市麻溝台 8 - 3 0 - 2
 C L L エクセレンス麻溝台 I 3 0 4 号

 【氏名】 江口 睦志

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

 【識別番号】 100093230

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西澤 利夫

 【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 009911

特 2 0 0 0 - 0 7 1 1 6 1

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト蛋白質と cDNA [9]

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2、4、6、8、10、12 または 14 のいずれかのアミノ酸配列を有する精製ヒト蛋白質。

【請求項 2】 請求項 1 の蛋白質をコードする DNA 断片。

【請求項 3】 請求項 1 の蛋白質をコードするヒト cDNA であって、1、3、5、7、9、11 または 13 の翻訳領域の塩基配列を有する DNA 断片。

【請求項 4】 配列番号 1、3、5、7、9、11 または 13 のいずれかの塩基配列からなる請求項 3 の DNA 断片。

【請求項 5】 請求項 2 から 4 のいずれかの DNA 断片をインビトロ翻訳あるいは宿主細胞内で発現しうる発現ベクター。

【請求項 6】 請求項 5 の発現ベクターによる形質転換体であって、請求項 1 の蛋白質を生産しうる形質転換細胞。

【請求項 7】 請求項 1 記載の蛋白質に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、精製ヒト蛋白質、この蛋白質をコードしている DNA 断片、この DNA 断片の発現ベクター、この発現ベクターにより形質転換した各種の細胞、およびこの蛋白質に対する抗体に関するものである。この発明の蛋白質は、医薬品として、あるいはこの蛋白質に対する抗体を作製するための抗原として用いることができる。また、この蛋白質は、細胞内蛋白質ネットワークを解明するための研究試薬として、あるいは低分子医薬と結合する蛋白質をスクリーニングするための蛋白質源として用いることができる。この発明のヒト cDNA は、遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として用いることができる。また、この cDNA がコードしている蛋白質を大量生産するための遺伝子源として用いることができる。これらの DNA をインビトロ翻訳あるいは宿主細胞内で発現しうる発現ベクターは、この発明の蛋白質をインビトロあるいは各種の宿主細胞

胞内で生産するのに用いることができる。これらの遺伝子を導入して蛋白質を過剰発現させた細胞は、対応するレセプターやリガンドの検出、新しい低分子医薬のスクリーニングなどに利用できる。この発明の蛋白質に対する抗体は、蛋白質を精製するための手段、あるいは細胞内における蛋白質の発現量や局在部位を調べるのに用いられる。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

ヒト蛋白質は、我々の身体を構成している細胞の基本要素である。その中には、（１）細胞の形態を維持したり、細胞内の物質輸送や細胞運動に関わっている細胞骨格蛋白質、（２）細胞内の物質代謝に関与する代謝酵素、（３）エネルギー産生に関わる蛋白質、（４）細胞の増殖・分裂に関わる情報伝達蛋白質、（５）蛋白質の合成に関わる翻訳関連蛋白質、（６）蛋白質の分解に関わるプロテアーゼ関連蛋白質、（７）ゲノムの複製に関与する蛋白質、（８）遺伝子の転写に関与する転写因子、（９）mRNAのスプライシングに関与する核蛋白質などが含まれる。これらの蛋白質は、ヒト細胞の働きを解明する上で重要であるのみならず、医薬品の開発においても有用である。これまで知られている低分子化合物医薬の多くは、細胞内のある特定の蛋白質と結合し、その蛋白質の働きを増強したり、阻止したりすることによって、その薬効を表す。したがって、一揃いのヒト蛋白質を持っていれば、これらの低分子医薬をスクリーニングする際の有力な道具となる。

【 0 0 0 3 】

従来、ヒト蛋白質を得るには、ヒト組織や培養細胞をすりつぶした後、各種の分離法を組み合わせて単一の蛋白質を精製する方法がとられてきた。これまで知られている蛋白質のように、含有量が高く、活性が分かっているものは、従来の方法で容易に単離精製できるが、まだ解析されていない蛋白質の多くは含量が低く、かつその性質によっては単離するのが困難である。また、ヒト組織の多くは入手困難である。したがって、従来のように蛋白質を単離精製する方法では、ヒト蛋白質を全てそろえることは不可能に近い。

【 0 0 0 4 】

一方、ヒト蛋白質の構造情報は、ヒトゲノムDNAに書かれているので、この情報をすべて読み取れば、全ヒト蛋白質の一次構造を推定することができる。ヒトゲノムプロジェクトの目的の一つはここにある。ただ、ゲノム解読の結果得られるのは、DNA配列情報だけであり、蛋白質そのものは得られない。細胞内では、ゲノムの情報はまずmRNAに転写され、mRNAの配列情報を翻訳して蛋白質が合成される。したがって、このmRNAを鋳型にして作製したcDNAが合成できれば、このcDNAを用いて対応する蛋白質も合成することが可能となる。そこで、各種細胞から単離したmRNAを鋳型にして、cDNAを合成し、cDNAの部分塩基配列を決定するいわゆるESTプロジェクトが進行している。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

蛋白質の取得を目的とする場合、cDNAに要求される必須要件は、蛋白質の翻訳領域を全て含んでいること、いわゆる完全長cDNAであることである。しかしながら、従来法で合成したcDNAは、完全長である割合は低く、得られたものが完全長かどうかを判定することも困難である。すなわち、ESTとして知られているものの多くは蛋白質の翻訳領域の一部のみ含んでいるcDNA断片である。

【 0 0 0 6 】

これに対して、この出願の発明者らは、独自の完全長cDNA合成技術を完成させている (Kato, S. et al., Gene 150:243-250, 1994)。そしてこの技術で合成したヒト完全長cDNAクローンを解析することにより、ヒト蛋白質を完全長cDNAの形で取得することが可能となった。この技術を用いてヒト完全長cDNAをすべてクローン化し、ヒト蛋白質バンクを作製することが望まれている。

【 0 0 0 7 】

また、これまでのヒト疾患に関する研究の結果、ほとんどの病気は何らかの形で遺伝子に異常があるために引き起こされることが明らかになりつつある。これらの病気を治療するためには、異常な遺伝子の代わりに正常な遺伝子を導入する

遺伝子治療が有望視されている。この際も、ヒトの完全長 cDNA は、遺伝子治療用の遺伝子源として用いることができる。

【 0 0 0 8 】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、新規の精製ヒト蛋白質、この蛋白質をコードする DNA 断片、この DNA 断片の発現ベクター、この発現ベクターにより形質転換された細胞およびこの蛋白質に対する抗体を提供することを課題としている。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(7)の発明を提供する。

- (1) 配列番号 2、4、6、8、10、12 または 14 のいずれかのアミノ酸配列を有する精製ヒト蛋白質。
- (2) 前記発明(1)の蛋白質をコードする DNA 断片。
- (3) 前記発明(1)の蛋白質をコードするヒト cDNA であって、1、3、5、7、9、11 または 13 の翻訳領域の塩基配列を有する DNA 断片。
- (4) 配列番号 1、3、5、7、9、11 または 13 のいずれかの塩基配列からなる前記発明(3)の DNA 断片。
- (5) 前記発明(2)から(4)のいずれかの DNA 断片をインビトロ翻訳あるいは宿主細胞内で発現しうる発現ベクター。
- (6) 前記発明(5)の発現ベクターによる形質転換体であって、前記発明(1)の蛋白質を生産しうる形質転換細胞。
- (7) 前記発明(1)の蛋白質に対する抗体。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

前記発明(1)の蛋白質は、ヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、この出願によって提供されるアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは前記発明(2)～(4)の DNA 断片を用いて組換え DNA 技術で生産する方法などにより取得することができるが、組換え DNA 技術で取得する方

法が好ましく用いられる。例えば、前記発明(3)または(4)のDNA断片(cDNA)を有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで蛋白質を発現できる。また翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換えることにより、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞で、DNA断片がコードしている蛋白質を大量に発現させることができる。

【0011】

前記発明(1)の蛋白質をインビトロ翻訳でDNA断片を発現させて生産させる場合には、例えば前記発明(3)または(4)のDNA断片の翻訳領域を、RNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに組換え、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含む、ウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、前記発明(1)の蛋白質をインビトロで生産することができる。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

【0012】

前記発明(1)の蛋白質を大腸菌などの微生物でDNA断片を発現させて生産させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、例えば前記発明(3)または(4)のDNA断片の翻訳領域を組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、このDNA断片がコードしている蛋白質を微生物内で大量生産することができる。この際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと停止コドンを付加して発現させれば、任意の領域を含む蛋白質断片を得ることができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。この融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによってこのcDNAがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。

【 0 0 1 3 】

前記発明(1)の蛋白質を、真核細胞でDNA断片を発現させて生産させる場合には、例えば前記発明(3)または(4)のDNA断片の翻訳領域を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに組換え、真核細胞内に導入すれば、前記発明(1)の蛋白質を真核細胞内で生産することができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。また、pIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1などを発現ベクターとして用いれば、Hisタグ、FLAGタグ、GFPなど各種タグを付加した融合蛋白質として発現させることもできる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巢細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、前記発明(1)の蛋白質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

【 0 0 1 4 】

前記発明(1)の蛋白質を原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から目的蛋白質を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどがあげられる。

【 0 0 1 5 】

前記発明(1)の蛋白質には、配列番号2、4、6、8、10、12または14のアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列からなるペプチド断片(5アミノ酸残基以上)も含まれる。これらのペプチド断片は抗体を作製するための抗原とし

て用いることができる。また、前記発明(1)の蛋白質の多くは、翻訳された後、細胞内で各種修飾を受ける。したがって、これらの修飾された蛋白質も前記発明(1)の蛋白質の範囲に含まれる。このような翻訳後修飾としては、N末端メチオニンの脱離、N末端アセチル化、糖鎖付加、細胞内プロテアーゼによる限定分解、ミリスチル化、イソプレニル化、リン酸化などが例示できる。

【 0 0 1 6 】

前記発明(2)～(4)のDNA断片には、前記(1)の蛋白質をコードするすべてのDNAが含まれる。このDNA断片は、化学合成による方法、cDNAクローニングによる方法、ヒトゲノムライブラリーをスクリーニングする方法などを用いて取得することができる。

【 0 0 1 7 】

前記発明(3)または(4)のDNA断片(cDNA)は、例えばヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローン化することができる。cDNAはヒト細胞から抽出したポリ(A)⁺RNAを鋳型として合成する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。cDNAは、岡山-Berg法(Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol. 2:161-170, 1982)、Gubler-Hoffman法(Gubler, U. and Hoffman, J., Gene 25:263-269, 1983)などいかなる方法を用いて合成してもよいが、完全長クローンを効率的に得るためには、実施例にあげたようなキャッピング法(Kato, S. et al., Gene 150:243-250, 1994)を用いることが望ましい。また市販のヒトcDNAライブラリーを用いることもできる。cDNAライブラリーから目的のcDNAをクローン化するには、この出願によって提供される前記発明(3)または(4)のcDNA(配列番号1、3、5、7、9、11または13)の任意部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いて、公知の方法によりコロニーあるいはブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行えばよい。また、目的とするcDNA断片の両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、ヒト細胞から単離したmRNAからRT-PCR法により、前記発明(3)または(4)のcDNA断片を調製することもできる。

【0018】

前記発明(3)のDNA断片は、配列番号1、3、5、7、9、11または13の翻訳領域(Open Reading Frame: ORF)の塩基配列を有するcDNAであり、前記発明(4)のDNA断片は、配列番号1、3、5、7、9、11または13のいずれかの塩基配列からなるcDNAである。それぞれのクローン番号(HP番号)、cDNAクローンが得られた細胞、cDNAの全塩基数、コードしている蛋白質のアミノ酸残基数をそれぞれ表1にまとめて示した。

【0019】

【表1】

配列番号	HP番号	細胞	塩基数	アミノ酸 残基数
1、 2	HP10456	U-2 OS	1290	199
3、 4	HP10498	Saos-2	564	118
5、 6	HP10501	胃癌	445	85
7、 8	HP10503	Saos-2	904	114
9、10	HP10505	Saos-2	472	87
11、12	HP10511	胃癌	180	39
13、14	HP10515	肝臓	473	102

【0020】

なお、配列番号1、3、5、7、9、11または13のいずれかの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、表1に示したヒト細胞株やヒト組織から作製したcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、前記発明(3)および(4)のcDNAと同一のクローンを容易に得ることができる。

【0021】

また、一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号1、3、5、7、9、11または13において、1または複数のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAもこの発明の範囲に含まれる。

【0022】

同様に、これらの変更によって生じる1または複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、配列番号2、4、6、8、10、12または14のアミノ酸配列を有するそれぞれの蛋白質の活性を有する限り、この発明の範囲に含まれる。

【0023】

前記発明(3)および(4)のDNA断片には、配列番号1、3、5、7、9、11または13の塩基配列のいかなる部分塩基配列からなるDNA断片(10bp以上)も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなるDNA断片もこの範囲に含まれる。これらのDNA断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。

【0024】

前記発明(7)の抗体は、前記発明(1)の蛋白質を抗原として用いて動物を免疫した後、血清から得ることが出来る。抗原としては配列番号2、4、6、8、10、12または14のアミノ酸配列に基づいて化学合成したペプチドや、真核細胞や原核細胞で発現させた蛋白質を用いることが出来る。あるいは、上記の真核細胞用発現ベクターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を採取することによって作製することができる(例えば、特開平7-313187号公報記載の方法)。動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリなどが用いられる。免疫した動物の脾臓から採取したB細胞をミエローマと融合させてハイブリドーマを作製すれば、前記発明(1)の蛋白質に対するモノクローナル抗体を産生することができる。

【0025】

【実施例】

次に実施例を示してこの出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。なお、以下の実施例において、DNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献("Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)の記載に方従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合は宝

酒造社製のものを用了。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。cDNA合成は文献 (Kato, S. et al., Gene 150:243-250, 1994) の記載に従った。

実施例 1 : cDNA クローニング

cDNA ライブラリーとして、ヒト完全長 cDNA ライブラリー (WO 97/33993、WO 98/11217、WO 98/21328 記載) を用了。個々のライブラリーから完全長 cDNA クローンを選択し、その全塩基配列決定を行った。得られたクローン (A) ~ (G) の詳細は以下のとおりである。

(A) HP 10456

ヒト骨肉腫細胞株 U-2 OS cDNA ライブラリーから得られたクローン HP 10456 の cDNA インサートの全塩基配列を決定したところ、99 bp の 5' 非翻訳領域、600 bp の ORF、591 bp の 3' 非翻訳領域からなる構造を有していた (配列番号 1)。ORF は 199 アミノ酸残基 (配列番号 2) からなる蛋白質をコードしており、インビトロ翻訳の結果、ORF から予想される分子量 22, 095 より大きい 31 kDa の翻訳産物が生成した (実施例 2)。この蛋白質と GFP との融合蛋白質は、細胞質に凝集塊として発現が認められた (実施例 4)。

【0026】

この蛋白質のアミノ酸配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、線虫 BC-2 様蛋白質 (アクセシオン番号 AAD03134) と類似性を有していた。図 1 に、クローン (A) がコードするヒト蛋白質と、線虫 BC-2 様蛋白質のアミノ酸配列の比較を示す。- はギャップを、* はこの発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、. はこの発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。全領域にわたって、56.9% の相同性を有していた。

【0027】

クローン (A) cDNA の塩基配列を用いて GenBank を検索したところ、EST の中に 90% 以上の相同性を有するもの (例えば、アクセシオン番号 C04706) が登録されていたが、部分配列なのでクローン (A) がコードする蛋白質と同じ蛋白質をコードしているかどうかは判定できない。

(B) HP10498

ヒト骨肉腫細胞株 S a o s - 2 c D N A ライブラリーから得られたクローン H P 1 0 4 9 8 の c D N A インサートの全塩基配列を決定したところ、23bpの5' 非翻訳領域、357bpのORF、184bpの3' 非翻訳領域からなる構造を有していた（配列番号3）。ORFは118アミノ酸残基（配列番号4）からなる蛋白質をコードしており、インビトロ翻訳の結果、ORFから予想される分子量13,466とほぼ同じ14の翻訳産物が生成した（実施例2）。この蛋白質とGFPとの融合蛋白質は、細胞全体に発現が認められた（実施例4）。

【0028】

この蛋白質のアミノ酸配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、線虫仮想蛋白質C24D19.6（アクセシオン番号AAB88317）と類似性を有していた。図2に、クローン（B）がコードするヒト蛋白質と、線虫仮想蛋白質C24D19.6のアミノ酸配列の比較を示す。－はギャップを、＊はこの発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、. はこの発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。中間部87アミノ酸残基にわたって、32.2%の相同性を有していた。

【0029】

クローン（B）cDNAの塩基配列を用いてGenBankを検索したところ、ESTの中に、90%以上の相同性を有するもの（例えば、アクセシオン番号AA431880）が登録されていたが、部分配列なのでクローン（B）がコードする蛋白質と同じ蛋白質をコードしているかどうかは判定できない。

(C) HP10501

ヒト胃癌cDNAライブラリーから得られたクローンHP10501のcDNAインサートの全塩基配列を決定したところ、36bpの5' 非翻訳領域、258bpのORF、151bpの3' 非翻訳領域からなる構造を有していた（配列番号5）。ORFは85アミノ酸残基（配列番号6）からなる蛋白質をコードしていた。インビトロ翻訳の結果、ORFから予想される分子量9,632よりやや大きい14kDaの翻訳産物が生成した（実施例2）。この蛋白質とGFPとの融合蛋白質は、細胞全体に発現が認められた（実施例4）。

【0030】

クローン (C) cDNAの塩基配列を用いてGenBankを検索したところ、ESTの中に、90%以上の相同性を有するもの（例えば、アクセッション番号AA460870）が登録されていたが、部分配列なのでクローン (C) がコードする蛋白質と同じ蛋白質をコードしているかどうかは判定できない。

(D) HP10503

ヒト骨肉腫細胞株Saos-2 cDNAライブラリーから得られたクローンHP10503のcDNAインサートの全塩基配列を決定したところ、466bpの5' 非翻訳領域、345bpのORF、93bpの3' 非翻訳領域からなる構造を有していた（配列番号7）。ORFは114アミノ酸残基（配列番号8）からなる蛋白質をコードしていた。この蛋白質とGFPとの融合蛋白質は、細胞全体に発現が認められた（実施例4）。

【0031】

クローン (D) cDNAの塩基配列を用いてGenBankを検索したところ、ESTの中に、90%以上の相同性を有するもの（例えば、アクセッション番号AA305157）が登録されていたが、部分配列なのでクローン (D) がコードする蛋白質と同じ蛋白質をコードしているかどうかは判定できない。

(E) HP10505

ヒト骨肉腫細胞株Saos-2 cDNAライブラリーから得られたクローンHP10505のcDNAインサートの全塩基配列を決定したところ、89bpの5' 非翻訳領域、264bpのORF、119bpの3' 非翻訳領域からなる構造を有していた（配列番号9）。ORFは87アミノ酸残基（配列番号10）からなる蛋白質をコードしており、インビトロ翻訳の結果、ORFから予想される分子量10, 734より大きい14kDaの翻訳産物が生成した（実施例2）。この蛋白質とGFPとの融合蛋白質は、ミトコンドリアに局在が認められた（実施例4）。

【0032】

この蛋白質のアミノ酸配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、線虫仮想蛋白質F29B9.10（アクセッション番号AAB09120）と類

似性を有していた。なお、線虫仮想蛋白質 F29B9.10 は細菌 30S リボソーム蛋白質 S21 と弱い類似性を有している。図 3 に、クローン (E) がコードするヒト蛋白質と、線虫仮想蛋白質 F29B9.10 のアミノ酸配列の比較を示す。－はギャップを、* はこの発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、. はこの発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。N 末端を除く 74 アミノ酸残基にわたって、39.2% の相同性を有していた。

【0033】

クローン (E) cDNA の塩基配列を用いて GenBank を検索したところ、EST の中に、90% 以上の相同性を有するもの（例えば、アクセシオン番号 AA029070）が登録されていたが、部分配列なのでクローン (E) がコードする蛋白質と同じ蛋白質をコードしているかどうかは判定できない。

(F) HP10511

ヒト胃癌 cDNA ライブラリーから得られたクローン HP10511 の cDNA インサートの全塩基配列を決定したところ、48bp の 5' 非翻訳領域、120bp の ORF、12bp の 3' 非翻訳領域からなる構造を有していた（配列番号 11）。ORF は 39 アミノ酸残基（配列番号 12）からなる蛋白質をコードしており、インビトロ翻訳の結果、ORF から予想される分子量 3,939 とほぼ同じ 4kDa の翻訳産物が生成した（実施例 2）。この蛋白質と GFP との融合蛋白質は、細胞全体に認められた（実施例 4）。

【0034】

クローン (F) cDNA の塩基配列を用いて GenBank を検索したところ、EST の中に、90% 以上の相同性を有するもの（例えば、アクセシオン番号 AA629178）が登録されていたが、部分配列なのでクローン (F) がコードする蛋白質と同じ蛋白質をコードしているかどうかは判定できない。

(G) HP10515

ヒト肝臓 cDNA ライブラリーから得られたクローン HP10515 の cDNA インサートの全塩基配列を決定したところ、34bp の 5' 非翻訳領域、309bp の ORF、130bp の 3' 非翻訳領域からなる構造を有していた（配列番号 13）。ORF は 102 アミノ酸残基（配列番号 14）からなる蛋白質をコ

ードしており、インビトロ翻訳の結果、ORFから予想される分子量12,259より大きい15kDaの翻訳産物が生成した（実施例2）。この蛋白質とGFPとの融合蛋白質は、細胞質に粒子状の発現が認められた（実施例4）。

【0035】

この蛋白質のアミノ酸配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、ショウジョウバエ仮想蛋白質63B12.s（アクセシオン番号CAA15941）と類似性を有していた。図4に、クローン（G）がコードするヒト蛋白質と、ショウジョウバエ仮想蛋白質63B12.sのアミノ酸配列の比較を示す。－はギャップを、＊はこの発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、.はこの発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。全領域にわたって、32.4%の相同性を有していた。

【0036】

クローン（G）cDNAの塩基配列を用いてGenBankを検索したところ、ESTの中に、90%以上の相同性を有するもの（例えば、アクセシオン番号AA349062）が登録されていたが、部分配列なのでクローン（G）がコードする蛋白質と同じ蛋白質をコードしているかどうかは判定できない。

実施例2：インビトロ翻訳による蛋白質合成

実施例1で単離したcDNAを有するプラスミドベクターを用いて、T_NTウサギ網状赤血球溶解物キット（プロメガ社製）によるインビトロ転写／翻訳を行なった。この際 [³⁵S]メチオニンを添加し、発現産物をラジオアイソトープでラベルした。いずれの反応もキットに付属のプロトコールに従って行なった。

【0037】

具体的な方法は次のとおりである。プラスミド2μgを、T_NTウサギ網状赤血球溶解物12.5μl、緩衝液（キットに付属）0.5μl、アミノ酸混合液（メチオニンを含まない）2μl、[³⁵S]メチオニン（アマーシャム社）2μl（0.37MBq/μl）、T7RNAポリメラーゼ0.5μl、RNasin20Uを含む総量25μlの反応液中で30℃、90分間反応させた。反応液3μlにSDSサンプリングバッファー（125mMトリス塩酸緩衝液、pH6.8、120mM2-メルカプトエタノール、2%SDS溶液、0.025%ブ

ロモフェノールブルー、20%グリセロール) 2 μ lを加え、95℃3分間加熱処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。オートラジオグラフィーを行ない、翻訳産物の分子量を求めた。

実施例3：COS7細胞による発現

実施例1で単離したcDNAを保有する発現ベクターによって形質転換した大腸菌を100 μ g/mlアンピシリン含有2xYT培地2ml中で37℃2時間培養した後、ヘルパーファージM13KO7 (50 μ l)を添加し、37℃で一晩培養した。遠心によって分離した上澄からポリエチレングリコール沈殿によって一本鎖ファージ粒子を得た。これを100 μ lの1mMトリス-0.1mMEDTA、pH8 (TE)に懸濁した。

【0038】

サル腎臓由来培養細胞COS7は、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル (DMEM) 培地中、5%CO₂存在下、37℃で培養した。1 \times 10⁵個のCOS7細胞を6穴プレート (ヌンク社、穴の直径3cm)に植え、5%CO₂存在下、37℃で22時間培養した。培地除去後、リン酸緩衝液で細胞表面を洗浄し、さらに50mMトリス塩酸 (pH7.5)を含むDMEM (TDMEM)で再度洗浄した。この細胞に一本鎖ファージ懸濁液1 μ l、DMEM培地0.6ml、TRANSFECTAMTM (IBF社) 3 μ lを懸濁したものを添加し、5%CO₂存在下、37℃で3時間培養した。サンプル液を除去後、TDMEMで細胞表面を洗浄し、10%ウシ胎児血清含有DMEMを1穴あたり2ml加え、5%CO₂存在下、37℃にて2日間培養した。培地を [³⁵S] システインあるいは [³⁵S] メチオニンを含む培地に交換した後、1時間培養した。遠心分離によって、培地と細胞を分けたあと、細胞画分の蛋白質をSDS-PAGEにかけた。

実施例4：緑色蛍光蛋白質 (GFP) 融合蛋白質の発現

EcoRI認識部位を付加した翻訳開始コドンから始まる26merのセンスプライマーとBamHI認識部位を付加した停止コドンまでを含む26merのアンチセンスプライマーを用い、目的蛋白質をコードするcDNAを鋳型としてPCRにより翻訳領域を増幅した。PCR産物をEcoRIとBamHIで消化し

、GFP融合蛋白質発現用ベクター pEGFP-N1 (Clontec社製) の EcoRI-BamHI 部位に挿入した。塩基配列を確認した後、得られた融合遺伝子発現ベクターを実施例3に記載の方法によりCOS7細胞にトランスフェクトした。蛍光顕微鏡により緑色蛍光の分布を観察し、目的蛋白質の局在部位を調べた。

実施例5：抗体の作製

EcoRI 認識部位を付加した翻訳開始コドンから始まる 26mer のセンスプライマーと SalI 認識配列を付加した停止コドンまでを含む 26mer のアンチセンスプライマーを用い、各 cDNA を鋳型として PCR により翻訳領域を増幅した。PCR 産物を EcoRI と SalI で消化し、pGEX-5X-1 (ファルマシア社製) の EcoRI と SalI 部位に挿入した。塩基配列を確認した後、宿主大腸菌 JM109 の形質転換を行った。LB 培地中で 37℃、5 時間培養し、IPTG を最終濃度が 0.4 mM になるように加え、さらに 37℃ で 4 時間培養した。菌体を遠心により分離し、溶解溶液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA、0.2 mM PMPF) に溶かし、一度 -80℃ で凍結させ融解させた後、超音波破碎を行った。10,000 x g で 30 分遠心し、上清にグルタチオンセファロース 4B を加え、4℃ で 1 時間インキュベートした。ビーズを十分洗浄した後、溶出溶液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、50 mM グルタチオン) で融合蛋白質を溶出した。得られた融合蛋白質を抗原として家兔に常法により免疫を行い抗血清を得た。抗血清はまず、40% 飽和硫酸沈殿画分を GST アフィニティーカラムにより GST 抗体を除いた。素通り画分をさらに GST 融合蛋白質の抗原カラムにより精製した。

【0039】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願によって、新規な精製ヒト蛋白質、これらの蛋白質をコードしている DNA 断片、この DNA 断片の発現ベクター、この発現ベクターによる形質転換細胞、およびこの蛋白質に対する抗体が提供される。この出願によって提供される蛋白質は、いずれも細胞内で機能している蛋白質と考えられるため、細胞内ターゲット蛋白質として、対応するレセプターやリガ

ンドの検出、新しい低分子医薬のスクリーニングなどに利用できる。またこの蛋白質に対する抗体を作製するための抗原として用いることができる。この出願によって提供されるDNA断片は、遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として用いることができる。また、このDNA断片を用いることにより、この蛋白質を大量に発現することができる。これら遺伝子を導入してこの蛋白質を発現させた細胞は、この蛋白質の修飾型を得るのに利用できる。この出願によって提供される抗体は、この発明の蛋白質の検出、定量、精製などに利用できる。

【 0 0 4 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Human Proteins and cDNAs thereof (9)

<130> NP00110-YS

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1290

<212> DNA

<213> Hom sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (100)..(699)

<400> 1

aaaaacaaag gagcggcggc cgggagcgga cttaccttac cttctctgcc ttcggcgcgc 60

ttctcagccg ggccgccgac ccaaaggagc cgtccgact atg tct aac atg gag 114

Met Ser Asn Met Glu

1

5

aaa cac ctg ttc aac ctg aag ttc gcg gcc aaa gaa ctg agt agg agt 162

Lys His Leu Phe Asn Leu Lys Phe Ala Ala Lys Glu Leu Ser Arg Ser

10

15

20

gcc aaa aaa tgc gat aag gag gaa aag gcc gaa aag gcc aaa att aaa 210

Ala Lys Lys Cys Asp Lys Glu Glu Lys Ala Glu Lys Ala Lys Ile Lys

25

30

35

aag gcc att cag aag ggc aac atg gaa gtt gcg agg ata cac gcc gaa 258

Lys Ala Ile Gln Lys Gly Asn Met Glu Val Ala Arg Ile His Ala Glu

40

45

50

aat gcc atc cgc cag aag aac cag gcg gtg aat ttc ttg aga atg agt 306

Asn Ala Ile Arg Gln Lys Asn Gln Ala Val Asn Phe Leu Arg Met Ser

55

60

65

gcg cga gtc gat gca gtg gct gcc agg gtc cag acg gcg gtg acg atg 354

Ala Arg Val Asp Ala Val Ala Ala Arg Val Gln Thr Ala Val Thr Met

70	75	80	85
ggc aag gtg acc aag tcg atg gct ggt gtg gtt aag tcg atg gat gcg 402			
Gly Lys Val Thr Lys Ser Met Ala Gly Val Val Lys Ser Met Asp Ala			
90		95	100
aca ttg aag acc atg aat ctg gag aag att tct gct ttg atg gac aaa 450			
Thr Leu Lys Thr Met Asn Leu Glu Lys Ile Ser Ala Leu Met Asp Lys			
105		110	115
ttc gag cac cag ttt gag act ctg gac gtc cag acg cag caa atg gaa 498			
Phe Glu His Gln Phe Glu Thr Leu Asp Val Gln Thr Gln Gln Met Glu			
120		125	130
gac acg atg agc agc acg acg acg ctc acc act ccc cag aac caa gtg 546			
Asp Thr Met Ser Ser Thr Thr Thr Leu Thr Thr Pro Gln Asn Gln Val			
135		140	145
gat atg ctg ctc cag gaa atg gca gat gag gcg ggc ctc gac ctc aac 594			
Asp Met Leu Leu Gln Glu Met Ala Asp Glu Ala Gly Leu Asp Leu Asn			
150		155	160
atg gag ctg ccg cag ggc cag acc ggc tcc gtg ggc acg agc gtg gct 642			
Met Glu Leu Pro Gln Gly Gln Thr Gly Ser Val Gly Thr Ser Val Ala			
170		175	180
tcg gcg gag cag gat gaa ctg tct cag aga ctg gcc cgc ctt cgg gat 690			
Ser Ala Glu Gln Asp Glu Leu Ser Gln Arg Leu Ala Arg Leu Arg Asp			
185		190	195

caa gtg tga cggcagaacc cgctctgagg tttcctggcc atagccaccc 739

Gln Val

200

tttgaaatgc tctctgtgtg ttagagagat actataccct agaaactctg aacacgccag 799

aatgctgaaa tgcccttcta ccttigggtt tacagccccc tccacataaa ttaagaaatt 859

cagtatttct gcactcttag ctggattcta aagtcttgta tagctcgtaa tgatgggtatt 919

tttatagcag ccttttaaca gaactagtta atttcgtgta tatgaatcct tctcgaagat 979

ctgggtcaaaa ctgtattcag tttcctgccc agaatgatca gattgaaggt ggttggtttt 1039

tattattatt tagtgtgatt gatagtatct agaatggcag gtgggtgcata aaagttaaag 1099

agaggggaaa gattacttag tttgggttata cagttataaa caccatgcag tgtattcggt 1159

ggactgtgct atttctgttt atcctttggg ttttggtttt tgtttttttt ttttgccttc 1219

acagtgagac tgcaaatgat tgttctcata acgtatatta ttaataaatg tggtcctata 1279

atttatactg g 1290

<210> 2

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ser	Asn	Met	Glu	Lys	His	Leu	Phe	Asn	Leu	Lys	Phe	Ala	Ala	Lys
1			5						10					15	
Glu	Leu	Ser	Arg	Ser	Ala	Lys	Lys	Cys	Asp	Lys	Glu	Glu	Lys	Ala	Glu
			20					25					30		
Lys	Ala	Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Ile	Gln	Lys	Gly	Asn	Met	Glu	Val	Ala
			35				40					45			
Arg	Ile	His	Ala	Glu	Asn	Ala	Ile	Arg	Gln	Lys	Asn	Gln	Ala	Val	Asn
		50				55				60					
Phe	Leu	Arg	Met	Ser	Ala	Arg	Val	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Arg	Val	Gln
65					70					75				80	
Thr	Ala	Val	Thr	Met	Gly	Lys	Val	Thr	Lys	Ser	Met	Ala	Gly	Val	Val
			85					90					95		
Lys	Ser	Met	Asp	Ala	Thr	Leu	Lys	Thr	Met	Asn	Leu	Glu	Lys	Ile	Ser
			100					105					110		
Ala	Leu	Met	Asp	Lys	Phe	Glu	His	Gln	Phe	Glu	Thr	Leu	Asp	Val	Gln
			115					120					125		
Thr	Gln	Gln	Met	Glu	Asp	Thr	Met	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Leu	Thr	Thr
			130					135					140		
Pro	Gln	Asn	Gln	Val	Asp	Met	Leu	Leu	Gln	Glu	Met	Ala	Asp	Glu	Ala
145					150					155				160	
Gly	Leu	Asp	Leu	Asn	Met	Glu	Leu	Pro	Gln	Gly	Gln	Thr	Gly	Ser	Val
			165						170				175		
Gly	Thr	Ser	Val	Ala	Ser	Ala	Glu	Gln	Asp	Glu	Leu	Ser	Gln	Arg	Leu
			180					185					190		
Ala	Arg	Leu	Arg	Asp	Gln	Val									
			195												

<210> 3

<211> 564

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (24)..(380)

<400> 3

gcctgccggg agcttgggtgc gct atg gcg aca ccc agc ctg cgg ggt cgt ctg 53

Met Ala Thr Pro Ser Leu Arg Gly Arg Leu

1 5 10

gcg cgg ttt ggg aac ccg cgg aag cct gtg ctg aag ccc aat aaa cct 101

Ala Arg Phe Gly Asn Pro Arg Lys Pro Val Leu Lys Pro Asn Lys Pro

15 20 25

ctc att cta gct aac cgc gtc ggg gag cgg cgc cgg gag aag ggc gag 149

Leu Ile Leu Ala Asn Arg Val Gly Glu Arg Arg Arg Glu Lys Gly Glu

30 35 40

gcg act tgc atc acg gag atg tcg gtg atg atg gct tgc tgg aag cag 197

Ala Thr Cys Ile Thr Glu Met Ser Val Met Met Ala Cys Trp Lys Gln

45 50 55

aat gaa ttc cgc gac gat gcg tgc aga aaa gag atc cag ggc ttc ctc 245

Asn Glu Phe Arg Asp Asp Ala Cys Arg Lys Glu Ile Gln Gly Phe Leu

60

65

70

gat tgt gcc gcg agg gct cag gaa gcc cga aag atg aga tca ata cag 293

Asp Cys Ala Ala Arg Ala Gln Glu Ala Arg Lys Met Arg Ser Ile Gln

75

80

85

90

gaa acc ctg gga gag tct ggg agt tta ctt cca aat aaa ttg aat aag 341

Glu Thr Leu Gly Glu Ser Gly Ser Leu Leu Pro Asn Lys Leu Asn Lys

95

100

105

ttg tta cag agg ttt cct aac aaa cct tac ctc agc tga aaatggacaa 390

Leu Leu Gln Arg Phe Pro Asn Lys Pro Tyr Leu Ser

110

115

gtattttcaa tgactgaaat atagcttctg acaactatgc agaggcattt tagagacatt 450

ggcattgccca tgccctcttt ggagggtaga agaggcaaaa cacttttttc acccttttga 510

atcatagtat gggtagaagt tatgatttat ctgaaataa aatcctctga acag 564

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

[illegible]

<210> 5

<211> 445

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (37) .. (294)

<400> 5

ctctcgagtc cgggccgcaa gtcccagacg ctgccc atg gag gcg tcc agc gag 54
Met Glu Ala Ser Ser Glu
1 5

ccg ccg ctg gat gct aag tcc gat gtc acc aac cag ctt gta gat ttt 102
Pro Pro Leu Asp Ala Lys Ser Asp Val Thr Asn Gln Leu Val Asp Phe
10 15 20

cag tgg aaa ctg ggt atg gct gtg agc tca gac act tgc aga tct ctt 150
Gln Trp Lys Leu Gly Met Ala Val Ser Ser Asp Thr Cys Arg Ser Leu
25 30 35

aag tat cct tac gtt gca gtg atg cta aaa gtg gca gat cat tca ggc 198
Lys Tyr Pro Tyr Val Ala Val Met Leu Lys Val Ala Asp His Ser Gly
40 45 50

caa gta aag acc aag tgc ttt gaa atg acg att cca cag ttt cag aat 246
Gln Val Lys Thr Lys Cys Phe Glu Met Thr Ile Pro Gln Phe Gln Asn
55 60 65 70

ttc tac aga cag ttc aag gaa att gct gca gtt att gaa acg gtg tga 294
Phe Tyr Arg Gln Phe Lys Glu Ile Ala Ala Val Ile Glu Thr Val
75 80 85

agacggattc tttggttgat aaattgctat cattctaaag tcatggactt cactttcggc 354

aacaaaacta aataaggatg gaacatttat tgaatgaaaa atgcactttt gtttttccat 414

ttttttaaat aataaaaatc agacaaacag g 445

<210> 6

<211> 85

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met	Glu	Ala	Ser	Ser	Glu	Pro	Pro	Leu	Asp	Ala	Lys	Ser	Asp	Val	Thr
1				5					10					15	
Asn	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Gln	Trp	Lys	Leu	Gly	Met	Ala	Val	Ser	Ser
			20					25						30	
Asp	Thr	Cys	Arg	Ser	Leu	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Val	Ala	Val	Met	Leu	Lys
		35					40						45		
Val	Ala	Asp	His	Ser	Gly	Gln	Val	Lys	Thr	Lys	Cys	Phe	Glu	Met	Thr
		50					55					60			
Ile	Pro	Gln	Phe	Gln	Asn	Phe	Tyr	Arg	Gln	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Ala
		65				70					75			80	
Val	Ile	Glu	Thr	Val											
															85

<210> 7

<211> 904

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (467)..(811)

<400> 7

actctgcgtg cgccggaggg tgccgtggcg ggtgggcccgc ctgacttctc ctcccggcca 60

gttctcgagc gcctcaccgg gcctcgccct gcagcctcgc tctcgctggc gctgcgcggc 120

ctaggggact gggctgctgg cctccgggtg cgggggtgggg gcaggctccg acctggggcg 180

tcctggccgc gcgagccgcg ggatgggggc ccgggcccgc gaggaggcgc cgctggtgtg 240

tccttgggtg gagagggcgc tgccggccct gcgcggtttc cagccaggaa gcttcgggaa 300

gcctggacgt ctgctcactg gagatgacac gtgcgtgggg tgttggcatt cttgttattt 360

aacacgggaa ggaggtgact tcgcctgtga tggacttcca gtgtgagcac tggccagagt 420

gaccaggctg accagcacca gccctgatcc agatgcagag gccagg atg tgg gcc 475

Met Trp Ala

1

cag ccc tgt gcc agg agg ctg gct gga ata aag gta cag ata gag gcc 523

Gln Pro Cys Ala Arg Arg Leu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile Glu Ala

5

10

15

tca ccc cct ctg gga cca ctg gca ctc agg gtg ttt gca gcc tca gag 571

Ser Pro Pro Leu Gly Pro Leu Ala Leu Arg Val Phe Ala Ala Ser Glu

20

25

30

35

ccc acc tgc ccc cag ggc cac agc tgc atc tcc tgc cct gct gtc att 619
Pro Thr Cys Pro Gln Gly His Ser Cys Ile Ser Cys Pro Ala Val Ile

40

45

50

aca ggg atg ggc agg ctg gca tgg ggg cac ccg ctg ccc ctg cct ggg 667
Thr Gly Met Gly Arg Leu Ala Trp Gly His Pro Leu Pro Leu Pro Gly

55

60

65

tgt tgc tgt gta ttc ctg ccg gcc agg ggc cac tgc cag gac cac gcc 715
Cys Cys Cys Val Phe Leu Pro Ala Arg Gly His Cys Gln Asp His Ala

70

75

80

tcc ctt ttc ata tcc cga ttc tta agt tct gct att gtg gta ttc tgg 763
Ser Leu Phe Ile Ser Arg Phe Leu Ser Ser Ala Ile Val Val Phe Trp

85

90

95

tgg aga aaa aag aac cgc gtg gct gtt ttt gaa ctg cct gga acc taa 811
Trp Arg Lys Lys Asn Arg Val Ala Val Phe Glu Leu Pro Gly Thr

100

105

110

115

gaccctgaat tcttttcccc cccaagggga aaatctatat ggaaaacatt tatttttaaaa 871

tacaggatga agtgaattaa aagatttaaa tgc 904

<210> 8

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Trp Ala Gln Pro Cys Ala Arg Arg Leu Ala Gly Ile Lys Val Gln
 1 5 10 15
 Ile Glu Ala Ser Pro Pro Leu Gly Pro Leu Ala Leu Arg Val Phe Ala
 20 25 30
 Ala Ser Glu Pro Thr Cys Pro Gln Gly His Ser Cys Ile Ser Cys Pro
 35 40 45
 Ala Val Ile Thr Gly Met Gly Arg Leu Ala Trp Gly His Pro Leu Pro
 50 55 60
 Leu Pro Gly Cys Cys Cys Val Phe Leu Pro Ala Arg Gly His Cys Gln
 65 70 75 80
 Asp His Ala Ser Leu Phe Ile Ser Arg Phe Leu Ser Ser Ala Ile Val
 85 90 95
 Val Phe Trp Trp Arg Lys Lys Asn Arg Val Ala Val Phe Glu Leu Pro
 100 105 110
 Gly Thr

<210> 9

<211> 472

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (90)..(353)

<400> 9

aatttccgct tccggtagtg agaacccttc cgggtgggcta ggtactgagc gcgcgaggct 60

ctacagagtg aaggtttaaa tccaaggctc atg gca aaa cat ctg aag ttc atc 113

Met Ala Lys His Leu Lys Phe Ile

1

5

gcc agg act gtg atg gta cag gaa ggg aac gtg gaa agc gca tac agg 161

Ala Arg Thr Val Met Val Gln Glu Gly Asn Val Glu Ser Ala Tyr Arg

10

15

20

acc cta aac aga atc ctc act atg gat ggg ctc att gag gac att aag 209

Thr Leu Asn Arg Ile Leu Thr Met Asp Gly Leu Ile Glu Asp Ile Lys

25

30

35

40

cat cgg cgg tat tat gag aag cca tgc cgc cgg cga cag agg gaa agc 257

His Arg Arg Tyr Tyr Glu Lys Pro Cys Arg Arg Arg Gln Arg Glu Ser

45

50

55

tat gaa agg tgc cgg cgg atc tac aac atg gaa atg gct cgc aag atc 305

Tyr Glu Arg Cys Arg Arg Ile Tyr Asn Met Glu Met Ala Arg Lys Ile

60

65

70

aac ttc ttg atg cga aag aat cgg gca gat ccg tgg cag ggc tgc tga 353

Asn Phe Leu Met Arg Lys Asn Arg Ala Asp Pro Trp Gln Gly Cys

75

80

85

ggcctgtggg tgggacaccc agtgcgaaac cctcatccag ttttctctcc atctcttttc 413

tttgtacaat cccatttcct attaccattc tctgcaataa actcaaatca catgtctgc 472

<210> 10

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met	Ala	Lys	His	Leu	Lys	Phe	Ile	Ala	Arg	Thr	Val	Met	Val	Gln	Glu
1				5					10					15	
Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Ala	Tyr	Arg	Thr	Leu	Asn	Arg	Ile	Leu	Thr	Met
			20					25					30		
Asp	Gly	Leu	Ile	Glu	Asp	Ile	Lys	His	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Pro
		35					40					45			
Cys	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Glu	Ser	Tyr	Glu	Arg	Cys	Arg	Arg	Ile	Tyr
	50				55					60					
Asn	Met	Glu	Met	Ala	Arg	Lys	Ile	Asn	Phe	Leu	Met	Arg	Lys	Asn	Arg
65					70					75				80	
Ala	Asp	Pro	Trp	Gln	Gly	Cys									
				85											

<210> 11

<211> 180

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(168)

<400> 11

attatatatg aattccattc aaatcgttcc tttttgttaa caaggggc atg ggg agg 57

Met Gly Arg

1

ggg ggt ggt ggt ggt gca gag gcg tct gac ccc agg aac ctg cag ggc 105

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Ala Ser Asp Pro Arg Asn Leu Gln Gly

5

10

15

ggg gct ggg tcg gtg ccc tct aag gac aat ttt gac ctt gtt caa cct 153

Gly Ala Gly Ser Val Pro Ser Lys Asp Asn Phe Asp Leu Val Gln Pro

20

25

30

35

ttc cac aaa gaa taa attgtgtttc ac

180

Phe His Lys Glu

40

<210> 12

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gly Arg Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Ala Ser Asp Pro Arg Asn
 1 5 10 15
 Leu Gln Gly Gly Ala Gly Ser Val Pro Ser Lys Asp Asn Phe Asp Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Phe His Lys Glu
 35

<210> 13
 <211> 473
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (35)..(343)

<400> 13

gagacgcaga gtcttgagca gcgcggcagg cacc atg ttc ctg act gcg ctc ctc 55

Met Phe Leu Thr Ala Leu Leu

1 5

tgg cgc ggc cgc att ccc ggc cgt cag tgg atc ggg aag cac cgg cgg 103

Trp Arg Gly Arg Ile Pro Gly Arg Gln Trp Ile Gly Lys His Arg Arg

10 15 20

ccg cgg ttc gtg tcg ttg cgc gcc aag cag aac atg atc cgc cgc ctg 151

Pro Arg Phe Val Ser Leu Arg Ala Lys Gln Asn Met Ile Arg Arg Leu

25

30

35

gag atc gag gcg gag aac cat tac tgg ctg agc atg ccc tac atg acc 199

Glu Ile Glu Ala Glu Asn His Tyr Trp Leu Ser Met Pro Tyr Met Thr

40

45

50

55

cgg gag cag gag cgc ggc cac gcc gcg gtg cgc agg agg gag gcc ttc 247

Arg Glu Gln Glu Arg Gly His Ala Ala Val Arg Arg Arg Glu Ala Phe

60

65

70

gag gcc ata aag gcg gcc gcc act tcc aag ttc ccc ccg cat aga ttc 295

Glu Ala Ile Lys Ala Ala Ala Thr Ser Lys Phe Pro Pro His Arg Phe

75

80

85

att gcg gac cag ctc gac cat ctc aat gtc acc aag aaa tgg tcc taa 343

Ile Ala Asp Gln Leu Asp His Leu Asn Val Thr Lys Lys Trp Ser

90

95

100

tcctgagtcg tcacccttgg attttatgga tcacggagct gaccatcttt acctggctcct 403

ggaactgaaa aactgtagct tgtgtgaaaa tgagcctttg gaccagtctt tattaaaaca 463

aacaaacatg

473

<210> 14

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met	Phe	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Trp	Arg	Gly	Arg	Ile	Pro	Gly	Arg	Gln
1				5					10					15	
Trp	Ile	Gly	Lys	His	Arg	Arg	Pro	Arg	Phe	Val	Ser	Leu	Arg	Ala	Lys
			20					25					30		
Gln	Asn	Met	Ile	Arg	Arg	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Glu	Asn	His	Tyr	Trp
		35					40					45			
Leu	Ser	Met	Pro	Tyr	Met	Thr	Arg	Glu	Gln	Glu	Arg	Gly	His	Ala	Ala
		50				55					60				
Val	Arg	Arg	Arg	Glu	Ala	Phe	Glu	Ala	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Thr	Ser
	65				70					75				80	
Lys	Phe	Pro	Pro	His	Arg	Phe	Ile	Ala	Asp	Gln	Leu	Asp	His	Leu	Asn
				85					90					95	
Val	Thr	Lys	Lys	Trp	Ser										
					100										

【図面の簡単な説明】

【図 1】

クローン HP 1 0 4 5 6 がコードするヒト蛋白質と、線虫 BC-2 様蛋白質の
アミノ酸配列を比較した図である。

【図 2】

クローン HP 1 0 4 9 8 がコードするヒト蛋白質と、線虫仮想蛋白質 C 2 4 D
1 9. 6 のアミノ酸配列を比較した図である。

【図 3】

クローン HP 1 0 5 0 5 がコードするヒト蛋白質と、線虫仮想蛋白質 F 2 9 B

9. 1 0 のアミノ酸配列を比較した図である。

【図 4】

クローン H P 1 0 5 1 5 がコードするヒト蛋白質と、ショウジョウバエ仮想蛋白質 6 3 B 1 2. s のアミノ酸配列を比較した図である。

【書類名】

図面

【図1】

HP10456	1'	MSNMEKHLFNLKFAAKELSRSAKKCDKEKAIAKIKKAIQKGNMEVARIHAEN *****
CEBC-2	1"	MGAGESSMALEKHLFDLKFPAKQLEKNAQCEKDEKVEKDKLTAAIKKGNKEVAQVHAEN *****
HP10456	55'	AIRQKNQAVNFLRMSARVDAVAARVQTAVTMGKVTKSMAGVVKSMDATLKTNNLEKISAL *****
CEBC-2	61"	AIRKKNIAVNYIKMAARIDAVAAARVQTAATQKRVTA SMSGVVKAMESAMKSMNLEKVQQL *****
HP10456	115'	MDKFEHQFETLDVQTTQOMEDTMSSTTTLTTPQNVDMILQEMADEAGLDLNMELPQGGTG *****
CEBC-2	121"	MDRFERDFEGLDVTTKTKTKMDGTTVLNAPKSVQVDALIAEADKAGIELNQELPSNVPT *****
HP10456	175'	SVGTSV-ASAEQDELSQRLRLRDQV *****
CEBC-2	181"	ALPTGTQAVSEDKDLTERLAALRNM *****

【图 2】

HP10498	1'	MATPSLRGLARFGNPRKPVLPKNKPLILANRV-GERRREKGEATCITEMSVNMA
CEC24	1"	MMFSSPLLKEKALARGKSIYPKVAVTSEILPLASKNRVQAGOKPRAASSCTQELQALFG *. *.. ** *** **** *.....*
HP10498	55'	CWKQNEFRDDACRKEIQGFLDCAAR-AQEARKWR--SIQETLGESGSLLPNKLNKLQRF * * . * * . * .. * .. * .. * .. *
CEC24	61"	CLKKWEFDVPCSKQHTLYMDCVHKGAEEAAAYRDATRKGTLGESGAGKGQSMTSAQFNK
HP10498	112'	PNKPYLS
CEC24	121"	IQLFFQPDLGKQFYROMKRLLPTQDYADDTFHRKHWSGKRS

【図 4】

```

HP10515 1' MFLTAL-LWRGRI.PGRQWICKHRRPRFVSLRAKQNMIRRLLEIEAENHYWLSMPYMTREQE
          * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * .
DM63B   1" MHLTLINLFKKTVPGHI.FRGKRLVKPVSQRAMDTLTREYERQEQVMILLLRHPYLTMEQS

HP10515 60' RCHA-AVRRREA.FEA--IKAAATSKFPFPHRFIADQLDHLNVTKKWS
          * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * .
DM63B   61" FGHAKELQKREKLVARWTFDEQTLRKNKPHVTIEERLNQLKKEAWD
    
```

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 精製ヒト蛋白質、この蛋白質をコードしている完全長 cDNA を含む DNA 断片、この DNA 断片の発現ベクター、この発現ベクターによる形質転換細胞およびこの蛋白質に対する抗体を提供する。

【解決手段】 配列番号 2、4、6、8、10、12 または 14 のいずれかのアミノ酸配列を有する精製ヒト蛋白質、配列番号 1、3、5、7、9、11 または 13 の翻訳領域の塩基配列を有する DNA 断片、この DNA 断片の発現ベクター、この発現ベクターによる形質転換細胞、およびこの蛋白質に対する抗体。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

